

## 2006/04/26

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-287538

(P2003-287538A)

(43) 公開日 平成15年10月10日 (2003.10.10)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 5/02	A
G 0 1 N 5/02		37/00	1 0 2

審査請求 未請求 請求項の数 9 OL (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-285845 (P2002-285845)

(22) 出願日 平成14年9月30日 (2002.9.30)

(31) 優先権主張番号 特願2002-18148 (P2002-18148)

(32) 優先日 平成14年1月28日 (2002.1.28)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000104722

キンセキ株式会社

東京都狛江市和泉本町1丁目8番1号

(72) 発明者 宮崎 茂行

東京都狛江市和泉本町1丁目8番1号 キンセキ株式会社内

(72) 発明者 判治 元康

東京都狛江市和泉本町1丁目8番1号 キンセキ株式会社内

(74) 代理人 100064621

弁理士 山川 政樹

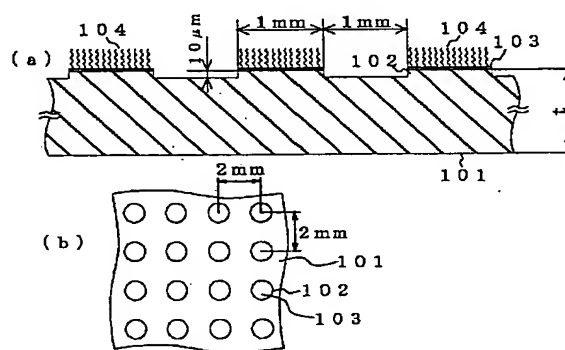
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAチップおよびDNA検査方法

(57) 【要約】

【課題】 容易にDNAの検査ができるようにする。

【解決手段】 水晶基板101上に複数の凸部102を形成し、各凸部102に所望のDNA断片104を固定する。この水晶基板101をDNAの2重螺旋構造が解ける程度の温度とした状態で、検体となるDNAを含んだ溶液中に所定時間浸漬する。この後、溶液温度を低下させてDNAが螺旋構造をとる状態としてから水晶基板を溶液中より引き上げ、これを純水で洗浄して乾燥する。この浸漬、乾燥の前後において、各凸部102における共振周波数を測定し、各凸部102において、浸漬、乾燥の前後における共振周波数の差を検出から、既知のDNA断片と同一塩基配列を検出することができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 所定の間隔で各々分離した複数の島部を備えた水晶基板と、

生化学物質の DNA に特有な塩基配列から構成されて各々の前記島部の上に固定された複数の DNA 断片とから構成されたことを特徴とする DNA チップ。

【請求項 2】 請求項 1 記載の DNA チップにおいて、前記島部上には金薄膜が形成され、

前記 DNA 断片は、一端が SH 基に置換され、

前記 SH 基により前記 DNA 断片が前記金薄膜に固定されていることを特徴とする DNA チップ。

【請求項 3】 請求項 1 記載の DNA チップにおいて、前記島部は、前記水晶基板の表面を親水性にする親水処理を施した領域であることを特徴とする DNA チップ。

【請求項 4】 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の DNA チップにおいて、

複数の前記島部上に、各々異なる塩基配列の DNA 断片が固定されていることを特徴とする DNA チップ。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の DNA チップにおいて、

前記島部は、前記水晶基板上に形成された凸部であることを特徴とする DNA チップ。

【請求項 6】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の DNA チップにおいて、

前記島部は、前記水晶基板上に形成された凹部であることを特徴とする DNA チップ。

【請求項 7】 所定の間隔で各々分離した複数の島部を備えた水晶基板を用意し、

各々の前記島部上に生化学物質の DNA に特有な塩基配列から構成された所望の DNA 断片を固定し、

前記 DNA 断片が固定された各々前記島部の共振周波数を測定して前記島部各々の第 1 の測定周波数とし、

前記島部上に固定された前記 DNA 断片を検体となる DNA を含んだ溶液中に所定時間接触させた後で乾燥し、

各々の前記島部の共振周波数を測定して前記島部各々の第 2 の測定周波数とし、

前記第 2 の測定周波数と第 1 の測定周波数との差により、前記検体となる DNA の中より前記 DNA 断片と同じ塩基配列を検出することを特徴とする DNA 検査方法。

【請求項 8】 請求項 7 記載の DNA 検査方法において、

前記島部は、前記水晶基板上に形成された凸部であることを特徴とする DNA 検査方法。

【請求項 9】 請求項 7 記載の DNA 検査方法において、

前記島部は、前記水晶基板上に形成された凹部であることを特徴とする DNA 検査方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、特定の塩基配列を有する DNA を検出する DNA チップを用いた DNA 検査方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、人の遺伝子構造がほぼ解明され、医療などの応用のために解明された遺伝子の持つ機能の調査、研究が本格化してきている。この遺伝子の機能解明のために、DNA チップが用いられている。DNA は、A（アデニン）、T（チミン）、C（シトシン）、G（グアニン）の 4 つの塩基により形成された 2 本の分子鎖が、螺旋状に結合して形成されたものである。4 つの塩基のうち、結合可能な組み合わせは、A と T、C と G である。

【0003】DNA チップは、ガラスやシリコンなどの基板上に、高密度に DNA 分子の断片を固定したものである。例えば、検体となる DNA を被検者の血液から抽出し、抽出した溶液中の DNA を 1 本鎖に分解した後、抽出した溶液を DNA チップの表面に滴下し、DNA チップ上の DNA 断片との結合を調べて検体の種類を判定する。

【0004】現在、開発され一部実用化されている DNA チップを用いた検出方式として、レーザーを照射して蛍光を測定する蛍光検出方式がある。この方式では、検体となる DNA に予め蛍光色素で標識をつけ、DNA チップ上の DNA 断片に結合した検体 DNA の有無を、レーザー光照射による蛍光色素の発光により検出している（非特許文献 1 参照）。

【0005】

【非特許文献 1】原田 学、佐藤 高遠、米田 英克、「DNA チップの現状と展望」、応用物理、第 69 巻、第 12 号（2000）

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、前述したような、従来の技術では、レーザー照射装置など大がかりな装置が必要となり、システムが高価なものとなる。また、定量的に検出することが容易ではなかった。本発明は、以上のような問題点を解消するためになされたものであり、容易に DNA の検査ができるようにすることを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の DNA チップは、所定の間隔で各々分離した複数の例えば凸部や凹部からなる島部を備えた水晶基板と、生化学物質の DNA に特有な塩基配列から構成されて各々の島部の上に固定された複数の DNA 断片とから構成されたものである。この DNA チップでは、各島部における共振周波数の変化により、各島部上に固定されている DNA 断片に結合した DNA の有無を検出する。

【0008】上記 DNA チップにおいて、島部上に金薄膜を形成し、DNA 断片は、一端を SH 基に置換し、こ

のSH基によりDNA断片を金薄膜に固定すればよい。また、島部は、水晶基板の表面を親水性にする親水処理を施した領域であってもよい。また、上記DNAチップにおいて、複数の島部上に、各々異なる塩基配列のDNA断片が固定されているようにしてもよい。

【0009】また、本発明のDNA検査方法は、所定の間隔で各々分離した複数の凸部や凹部などからなる島部を備えた水晶基板を用意し、各々の島部上に生化学物質のDNAに特有な塩基配列から構成された所望のDNA断片を固定し、DNA断片が固定された各々島部の共振周波数を測定して島部各々の第1の測定周波数とし、島部上に固定されたDNA断片を、検体となるDNAを含んだ溶液中に所定時間接触させた後で乾燥し、各々の島部の共振周波数を測定して島部各々の第2の測定周波数とし、第2の測定周波数と第1の測定周波数との差により、検体となるDNAの中よりDNA断片と同じ塩基配列を検出するようにしたものである。このDNA検査方法によれば、各島部における第1の測定周波数と第2の測定周波数との差により、各島部上に固定されているDNA断片に結合したDNAの有無を検出する。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について図を参照して説明する。図1は、本発明の実施の形態におけるDNAチップの構成を示す断面図(a)と平面図(b)である。このDNAチップは、ATカットの水晶基板101上に、直径1mm程度、高さ10μm程度の複数の凸部(島部)102が、2mm間隔でマトリクス状に形成され、これら複数の凸部102上に形成された金薄膜103の表面に、所望とする複数のDNA断片104が各々固定されているものである。

【0011】凸部102の上へのDNA断片104の固定は、つぎに示すようにする。まず、所望とするDNA断片の一端がSH基で置換された状態とする。次いで、SH基で一端が置換されたDNA断片が分散している溶液中に、金薄膜103が各凸部102の表面に形成された水晶基板101を浸漬する。このことにより、金薄膜103の上にSH基が引き寄せられて固着する。この結果、金薄膜103の表面にSH基を介してDNA断片104が固定された状態となる。この後、水晶基板101は、純水で洗浄してから乾燥すればよい。

【0012】以下に、この実施の形態におけるDNA検査方法について説明する。まず、DNA断片104が固定されていない状態の水晶基板101の各凸部102の共振周波数( $F_0$ :基本振動数)を測定する。つぎに、前述した方法により、所望のDNA断片104を各々異なる凸部102上に固定し、水晶基板101を純水で洗浄して乾燥した後、複数のDNA断片104が固定されている領域(島部)である各凸部102の共振周波数( $F_1$ :第1の測定周波数)を測定する。

【0013】ここで、各凸部102上においてDNA断

片104が形成される領域の面積A、凸部102部分の厚さt、水晶の密度ρ、共振周波数の変化ΔF、上記面積Aの領域の上における質量変化Δm、とすると、これらの関係は、「 $-\Delta F = (F_0 \cdot \Delta m) / (\rho \cdot A \cdot t)$ 」で示される。したがって、各凸部102に固定されたDNA断片104によって、質量変化Δm1が生じ、共振周波数の変化( $\Delta F_{01} = F_0 - F_1$ )として検出することができる。

【0014】つぎに、DNAの2重螺旋構造が解ける程度の温度とした状態で、検体となるDNAを含んだ溶液中にDNA断片104が固定された水晶基板101を所定時間浸漬するなどにより、DNA断片104部分を上記溶液に接触させる。この後、溶液温度を低下させてDNAが螺旋構造をとる状態としてから水晶基板を溶液中より引き上げ、これを純水で洗浄して乾燥し、各凸部102の共振周波数( $F_2$ :第2の測定周波数)を測定する。

【0015】このとき、検体となるDNAの塩基配列の中に、DNA断片104と同じ塩基配列が存在すると、前述した水晶基板101の溶液に対する浸漬により、同じ塩基配列が存在するDNAはDNA断片104に結合する。DNA断片104と同じ塩基配列が存在するDNAが結合した場合、このDNA断片104が固定されている凸部102上では、質量が増加(変化)したことになる。すなわち、検体となるDNAと同じ塩基配列を有するDNA断片104が固定された凸部102における質量変化(Δm2)は、固定されたDNA断片104およびこのDNA断片104に結合したDNAによるものである。

【0016】したがって、水晶基板101を上記DNAを含んだ溶液に浸漬する前後で、 $F_1$ と $F_2$ との差があれば、質量変化(Δm1、Δm2)に差があることになる。よって、 $F_1$ と $F_2$ との差が発生した凸部102上において、先に固定してあったDNA断片104に検体中のDNAが結合することによる質量の変化(増加)が発生したことが検出できる。すなわち、DNA断片同士の結合による質量増加が、凸部102毎の共振周波数の測定により $F_1$ と $F_2$ との差として検出されるので、どの凸部102に $F_1$ と $F_2$ との差が生じたかを調べることで、検体となるDNAの中よりDNA断片104と同じ塩基配列を検出することが可能となる。

【0017】このように、基本振動数 $F_0$ をもとに、 $F_1$ と $F_2$ との差から、水晶基板101を上記DNAを含んだ溶液に浸漬する前後における各々の凸部102上の質量変化を検出し、各々の凸部102における $F_1$ と $F_2$ との差(質量変化)の有無により検体となるDNAの中よりDNA断片104と同じ塩基配列を検出する。また、凸部102上のDNA断片104に結合した検体のDNAの質量は、 $\Delta m = -(F_2 - F_1) \cdot (\rho \cdot A \cdot t) / F_0$ により求めることができる。また、 $F_0$ と $F_1$ の差か

ら、各々の凸部102上に固定されているDNA断片104の質量も得られるので、1個のDNA断片の質量が判明していれば、凸部102上に固定されているDNA断片104の数も求めることができる。

【0018】ここで、凸部102の共振周波数の測定について簡単に説明する。図2に示すように、下部電極201上に水晶基板101を載置し、水晶基板101上に上部電極202が複数設けられた上部電極固定絶縁基板203を対向配置し、上部電極202の各々が、各凸部102上に配置された状態とする。なお、下部電極201は、水晶基板101の裏面全域にわたる大きさに形成され、上部電極202は、凸部102と同一の間隔で、上部電極固定絶縁基板203にマトリクス状に配置されている。

【0019】以上に説明したように下部電極201および上部電極202を配置したら、測定対象の凸部102上に配置されている上部電極202と下部電極201との間に、発振回路204より所定の周波数の信号を供給し、周波数カウンタ205により共振周波数を計測する。

【0020】また、図3に示すように、各上部電極202より各々配線を取り出し、切り替え器301により適宜切り替えながら、各凸部102の共振周波数を逐次測定するようにしてもよい。また、各々の凸部102上に、各々異なる塩基配列のDNA断片を固定し、複数種類の検体が同時に測定できるようにしてもよい。

【0021】なお、上述した実施の形態では、水晶基板上に、所定の間隔で各々分離した複数の凸部を備えるようにしたが、これに限るものではない。例えば、図4に示すように、水晶基板401の上に所定の間隔で各々分離した複数の凹部402を備え、各々の凹部402の底面上に金薄膜403を形成し、金薄膜403の表面にDNA断片104を固定するようにしてもよい。

【0022】ところで、上述した実施の形態では、水晶基板に金属膜を形成してこの上にDNA断片を固定するようにしたが、図5に示すように、水晶基板に直接DNA断片を固定してもよい。図5に示すDNAチップは、ATカットの水晶基板101上に、直径1mm程度の円形領域の親水処理部502が2mm間隔でマトリクス状に形成され、これら複数の親水処理部502の上に、所望とする複数のDNA断片104が各々固定されているものである。

【0023】親水処理部502上へのDNA断片104の固定は、親水処理がされた部分とDNAは容易に結合することから、つぎに示すようにする。所望とするDNA断片が分散している溶媒中に、親水処理部502が形成された水晶基板101を浸漬する。このことにより、親水処理部502の上にDNA断片104が引き寄せられて固着する。この結果、親水処理部502の表面にDNA断片104が固定された状態となる。この後、水晶

基板101は、純水で洗浄してから乾燥すればよい。

【0024】図5のDNAチップにおいても、つぎに示すことにより、親水処理部502における水晶基板101の共振周波数を測定することができる。まず、下部電極201上に水晶基板101を載置し、水晶基板101上に上部電極202が複数設けられた上部電極固定絶縁基板203を対向配置し、上部電極202の各々が、所定の間隔で各親水処理部502上に配置された状態とする。なお、下部電極201は、水晶基板101の裏面全域にわたる大きさに形成され、上部電極202は、親水処理部502と同一の間隔で、上部電極固定絶縁基板203にマトリクス状に配置されている。

【0025】以上に説明したように下部電極201および上部電極202を配置したら、測定対象の親水処理部502上に配置されている上部電極202と下部電極201との間に、発振回路204より所定の周波数の信号を供給し、周波数カウンタ205により共振周波数を計測する。このようにして、親水処理部502の領域の共振周波数を測定し、また、親水処理部502におけるDNA断片104の有無およびDNA断片104に同じ塩基配列が存在する検体のDNAが結合したの各々において共振周波数を測定すれば、前述と同様にDNAの測定検査が行える。

【0026】ところで、図5に示す実施の形態においても、図1に示したように、水晶基板101に複数の凸部を設け、この凸部の上面に親水処理を施し、親水処理された凸部の上面にDNA断片を固定するようにしてもよい。また、隣り合う親水処理部502の間に溝を設け、親水処理部502と他の部分とに段差を設けるようにしてもよい。これらのように、段差を設けることで、DNA断片が固定されている島部が、段差が無く平坦な状態より発振しやすい状態となる。

【0027】

【発明の効果】以上に説明したように、本発明によれば、水晶基板上に複数の島部を形成し、各島部における第1の測定周波数と第2の測定周波数との差により、各島部上に固定されているDNA断片に結合したDNAの有無を検出するようにしたので、DNAの検査がより容易に行えるようになるというすぐれた効果が得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の実施の形態におけるDNAチップの構成例を示す概略的な断面図(a)と平面図(b)である。

【図2】 本発明の実施の形態におけるDNA検査方法を説明するための概略的な構成図である。

【図3】 本発明の他の形態におけるDNA検査方法を説明するための概略的な構成図である。

【図4】 本発明の他の形態におけるDNAチップの構成例を示す概略的な断面図である。

【図5】 本発明の他の実施の形態におけるDNAチッ

(5)

特開2003-287538

7

8

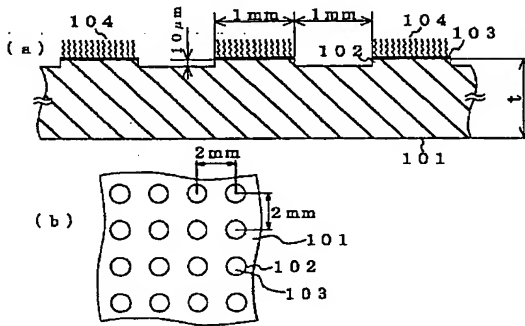
ブの構成例を示す概略的な断面図である。

\* 101…水晶基板、102…凸部（島部）、103…金

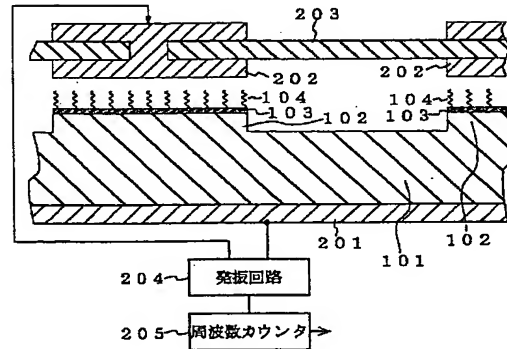
【符号の説明】

\* 薄膜、104…DNA断片。

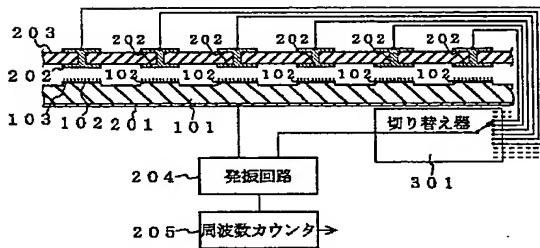
【図1】



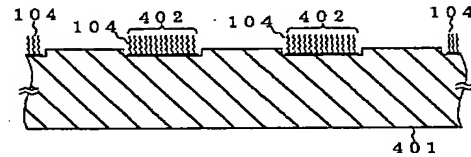
【図2】



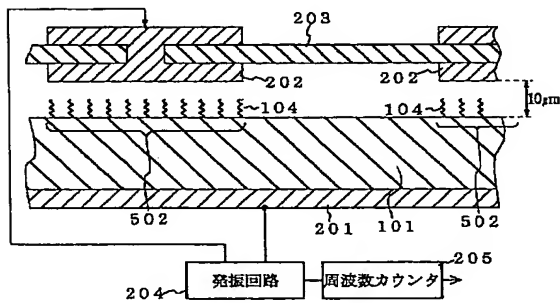
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード (参考)

G 0 1 N 37/00

1 0 2

C 1 2 N 15/00

F

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 HA14  
4B029 AA07 BB20 CC03 FA15  
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QR32  
QR55 QR84 QS15 QS32 QS39  
QX04